

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 <b>C07K 7/06, A61K 38/26, 38/30, 38/00</b>		A1	(11) 国際公開番号 <b>WO99/51627</b>  (43) 国際公開日 <b>1999年10月14日(14.10.99)</b>
<p>(21) 国際出願番号 <b>PCT/JP99/01796</b></p> <p>(22) 国際出願日 <b>1999年4月5日(05.04.99)</b></p> <p>(30) 優先権データ            特願平10/108662 1998年4月4日(04.04.98) JP            特願平10/112819 1998年4月8日(08.04.98) JP         </p> <p>(71) 出願人；および            坂本賢二(SAKAMOTO, Kenji)[JP/JP]            〒010-1233 秋田県河辺郡雄和町女米木字高麓沢25 Akita, (JP)         </p> <p>(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について）            名越秀夫(NAKOSHI, Hideco)[JP/JP]            〒224-0061 神奈川県横浜市都筑区大丸10番9-103号            Kanagawa, (JP)         </p> <p>(74) 代理人            弁理士 谷川英次郎(TANIGAWA, Hidejiro)            〒102-0072 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号            岩田ビル6階 谷川国際特許事務所 Tokyo, (JP)         </p>		<p>(81) 指定国 AU, BR, CA, CN, JP, KR, RU, US, 欧州特許            (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,            NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類            國際調査報告書</p> <p style="text-align: right;"><b>RECEIVED</b>  <b>MAR 23 2001</b>  <b>TECH CENTER 1600/2900</b></p>	
<p>(54) Title: <b>METHOD FOR SEARCHING PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES, PROCESS FOR PRODUCING THESEES SUBSTANCES AND DRUGS FOUND BY THE SEARCHING METHOD</b></p> <p>(54) 発明の名称 生理活性物質の探索方法及び製造方法並びに該探索方法により見出された医薬</p> <p><b>(57) Abstract</b>            A method for efficiently searching novel physiologically active substances under a certain predictability. This searching method comprises, among receptors of cells producing an antagonist to a substance <i>in vivo</i> or receptors of cells producing an antagonist to the cells per se, finding a receptor having amino acid sequences of two or more sizes by comparing the cDNA sequences of the receptor; and then examining which region in the longer receptor is missed in the shorter receptor by comparing the above cDNA sequences. By using this method, remedies for diabetes comprising a peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 or 5, insulin production regulators comprising a peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2, and gastric secretion inhibitors comprising a peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:3 or 4 are provided.</p>			

一定の予測性をもってより効率的に新規な生理活性物質を探索する方法及び該方法により見出された医薬が開示されている。本発明の生理活性物質の探索方法では、生体内の物質に拮抗作用を示す物質を産生する細胞のレセプター、又は該細胞自体に対して拮抗作用を有する物質を産生する細胞のレセプターにおいて、同一のレセプターのアミノ酸配列について2種類以上のサイズのものが存在するものを、該レセプターのcDNAの配列を比較することにより調べ、かつ長いレセプターのどの領域が短いレセプターにおいて欠失しているかを上記cDNAの配列を比較することにより調べる。この方法により、配列番号1又は5で示されるアミノ酸配列を有するペプチドから成る糖尿病治療薬、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するペプチドから成るインシュリン産生調節剤、配列番号3又は4で示されるアミノ酸配列を有するペプチドから成る胃酸分泌抑制剤が提供された。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RJ ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL ハンガリー
BB ブルバドス	GD イレナダ	LU ルクセンブルグ	SN ゼネザル
BE ベルギー	GE イルジア	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BI ブルガリア	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャーハン
BG ブルガリア	GM グンビア	MC モナコ	TG トーゴ
BI バナン	GN ギニア	MD モルディブ	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサオ	MG マダガスカル	TZ ダンザニア
BY ベルarus	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM トルクメニスタン
CA カナダ	HR ハローアチア	共和国	TR ハルコ
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	ML マリ	TT トリニダード・トバゴ
CG コンゴ	ID インドネシア	MN モンゴル	UA ハクニイナ
CH スイス	IE アイルランド	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CI コートジボアール	IL イスラエル	MW マラウイ	US 米国
CM カメルーン	IN インダ	MX メキシコ	UZ ロズベキスタン
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジェール	VN ベトナム
CR コスタリカ	IT イタリア	NL オランダ	YU ニューサーラビア
CU キューバ	JP 日本	NO ノルウェー	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュージーランド	ZW ジンバブエ
CZ チェコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

## 明細書

生理活性物質の探索方法及び製造方法並びに該探索方法により見出された医薬

### 技術分野

本発明は、新規な各種生理活性物質の探索方法及び製造方法並びに該探索方法

5 により見出された医薬に関する。

### 背景技術

従来、未知の生理活性物質の探索は、体液や組織中に存在する成分を分析し、新規な物質を同定及び単離し、発見された新規な物質の生理活性を調べることにより行なわれている。

10 上記した従来の方法は、生体中の成分を分析し、新たな物質を見つけ出してその生理活性を調べることから成る。しかしながら、生体中には極めて多くの成分が存在するし、生理活性物質はしばしば低濃度でしか存在しないから新規な物質を見つけることは困難な仕事である。しかも、生体は非常に多くの生理反応を行なっているので、新たに見つかった物質がどのような生理活性を有しているかを見つけることも困難である。このように、従来の方法では、新規な生理活性物質を見つけだすのは困難な作業である。

### 発明の開示

従って、本発明の目的は、一定の予測性をもってより効率的に新規な生理活性物質を探索する方法を提供することである。さらにまた、本発明の目的は、上記方法により探索された生理活性物質の製造方法を提供することである。さらに本発明の目的は、上記本発明の方法により探索された、新規な糖尿病治療薬、インシュリン産生調節剤、胃酸分泌調節剤及び成長ホルモン分泌調節剤を提供することである。

25 本願発明者は、先に、一定の予測性をもってより効率的に新規な生理活性物質を探索する方法を発明し、特許出願した(特開平10-109997号公報)。この方法は、拮抗作用を有する物質若しくは細胞が生体中に存在する物質のレセプター、又はある物質Aが作用する細胞に対して拮抗作用を有する細胞若しくは物質が生体中に存在する該物質Aのレセプターであって、同一のレセプターにつき

2種類以上のサイズのものが存在する場合に、その欠失部分、つまりスプライスされた部分のアミノ酸配列が該レセプターに関する生理活性を有するという知見に基づくものである。

本願発明者は、上記先願の探索方法を行うに際し、現実に存在することがわかっているレセプターのアミノ酸配列に基づくもののみならず、該レセプターのcDNAが2種類以上存在する場合に、そのcDNAの塩基配列に基づいてレセプターのアミノ酸配列を推定する方法も有効であることを現実に確認して本発明を完成した。

すなわち、本発明は、生体内の物質に拮抗作用を示す物質を產生する細胞のレセプター、又は該細胞自体に対して拮抗作用を有する物質を生産する細胞のレセプターにおいて、同一のレセプターのアミノ酸配列について2種類以上のサイズのものが存在するものを、該レセプターのcDNAの配列を比較することにより調べ、かつ長いレセプターのどの領域が短いレセプターにおいて欠失しているかを上記cDNAの配列を比較することにより調べることを含む、生理活性物質の探索方法を提供する。また、本発明は、上記本発明の方法により判明した欠失領域又はその誘導体を作製することから成る、生理活性ペプチドの製造方法を提供する。さらに、本発明は、上記本発明の方法により探索に成功したペプチドである、配列表の配列番号1又は5で示されるアミノ酸配列を有するペプチド又は該配列中の1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するペプチドであって、インシュリン產生細胞によるインシュリン生産を増大させる効果を有するペプチドを有効成分として含有する糖尿病治療薬を提供する。さらに、本発明は、配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するペプチド又は該配列中の1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するペプチドであって、インシュリン產生細胞によるインシュリン生産を調節できる効果を有するペプチドを有効成分として含有する、インシュリン产生調節剤を提供する。さらに、本発明は、配列表の配列番号3又は4で示されるアミノ酸配列を有するペプチド又は該配列中の1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するペプチドであって、胃酸

分泌を調節できる効果を有するペプチドを有効成分として含有する、胃酸分泌調節剤を提供する。配列表の配列番号6で示されるアミノ酸配列を有するペプチド又は該配列中の1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するペプチドであって、成長ホルモンの生産を調節できる効果を有するペプチドを有効成分として含有する、成長ホルモン生産調節剤を提供する。

5 本発明により、レセプターのcDNAの塩基配列に基づき、一定の予測性をもって効率的に新規な生理活性物質を探索する方法が提供された。本発明の方法では、拮抗作用に関与する物質のレセプターを調べることにより新規な生理活性物質を見つけることができるので、従来のように極めて多様な成分を含む生体試料10 中に微量含まれる生理活性物質を単離する必要がない。また、探索された生理活性物質の生理活性は、上記拮抗作用に関与するものであるから、その生理活性を探索することも従来に比べてはるかに容易である。よって、本発明の方法によれば、従来よりもはるかに高効率に新規な生理活性物質を探索することができる。

15 また、本発明により、優れたインシュリン生産増大効果を有する新規な糖尿病治療薬が提供された。さらに、新規なインシュリン産生調節剤、胃酸分泌調節剤及び成長ホルモン生産促進剤が提供された。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の生理活性物質の探索方法では、生体内の物質に拮抗作用を示す物質を产生する細胞のレセプター、又は該細胞自体に対して拮抗作用を有する物質を生20 産する細胞のレセプターにおいて、同一のレセプターのアミノ酸配列について2種類以上のサイズのものが存在するものを、該レセプターのcDNAの配列を比較することにより調べ、かつ長いレセプターのどの領域が短いレセプターにおいて欠失しているかを上記cDNA又は成熟mRNAの配列を比較することにより調べる。

25 すなわち、本発明の方法では、成熟mRNAの塩基配列の相違に基づいてサイズの異なる2種類以上のレセプターが生じる場合を対象とする。換言すると、本発明の方法では、mRNAレベルでのスプライシングの変化を探索する。mRNA レベルのスプライシングの変化によって生じる、通常起こらないスプライシ

グは遺伝子発現を不活性化する以外の働きは良くわかっていない。ケースとしては、本来翻訳されるべき配列が結果的にされなかったり、また逆に翻訳されるべきでないものが発現されたりする場合がある。その大部分は、正しくスプライシングされないために、アミノ酸すら発現できなくなるが、それ以外の場合、スプライシングの変化に対応して生じる、あるいは欠失するアミノ酸配列が、有効に機能している場合が実際にあり、本発明の方法ではこのような、mRNAレベルでのスプライシングの変化を探索する。

本発明の方法では、上記レセプターのcDNAの塩基配列を調べ、同じレセプターでありながら、サイズが異なるcDNAが存在するものを見つけ出す。この作業は、当該レセプターのcDNAの塩基配列又はサイズを複数回決定することにより行なってもよいし、文献に報告されている場合にはその報告を利用してよい。同一のレセプターでありながらサイズが異なる2種類以上のcDNAが存在するレセプターの例として、グルカゴンレセプター、FGFレセプター、GIPレセプター等を挙げることができる。

上記方法により生理活性を有することが認められた欠失領域と同一のペプチドは、これを製造することにより生理活性物質が得られる。多くの場合、欠失領域は比較的短いペプチドから成るので、このような場合には市販のペプチド合成機を用いて、化学合成により容易に当該生理活性物質を作製することができる。あるいは、常法により遺伝子工学的手法を用いて作製することもできる。

得られた生理活性物質の生理活性は、上記拮抗作用に関与するものであるから、それぞれの拮抗作用に応じた適宜の方法により容易に確認することができる。

なお、一般に生理活性を有するペプチドにおいて、その少数のアミノ酸が他のアミノ酸に置換し、少数のアミノ酸が付加され、又は少数のアミノ酸が欠失した場合でも、その生理活性が維持される場合があることは当業者に周知の事実である。従って、上記の欠失領域を構成するアミノ酸のうち、少数のアミノ酸が他のアミノ酸に置換し、少数のアミノ酸が付加され、又は少数のアミノ酸が欠失したものであって、上記欠失領域から成る生理活性物質が持つ生理活性を有する物質（本願発明においてこのような物質を上記欠失領域の「誘導体」という）を製造

することも本発明の範囲に含まれる。このような誘導体は上記欠失領域に対し、70%以上、さらに好ましくは90%以上の相同性を有することが好ましい。

本願発明者は、上記した本発明の探索方法により、インシュリン産生細胞によるインシュリン生産を増大させる効果を有するペプチドを見出した。このペプチドは、インシュリン産生細胞によるインシュリン生産を増大させる効果を有するので、糖尿病治療薬として有効である。すなわち、下記実施例において具体的に記載するように、グルカゴンレセプターのcDNAにサイズの異なる複数の種類のものが存在することが公知の文献に記載されており、これらのcDNAの塩基配列を比較することにより、長い方のアミノ酸配列をコードする塩基配列中のどの領域が、短い方のアミノ酸配列をコードする塩基配列中で欠失しているかを調べ、その欠失している塩基配列がコードするアミノ酸配列を推定した(配列番号1)。そして、配列番号1に示すアミノ酸配列を有するペプチドを化学合成し、インシュリン産生細胞に投与したところ、該細胞によるインシュリン生産量が有意に増大した。このことから、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するペプチドが糖尿病治療薬として有効であることがわかった。

なお、配列番号1で示されるアミノ酸配列中の1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するペプチドであって、インシュリン産生細胞によるインシュリン生産を増大させる効果を有するペプチドも本発明の範囲に含まれる。このようなペプチドの具体例として、ラットのグルカゴンレセプターのcDNAを比較することにより本願発明の方法に基づいて見出された、配列番号5に記載されたアミノ酸配列を有するペプチドを挙げることができる。なお、インシュリン生産を増大させる効果を有する、配列番号1又は5に記載されたアミノ酸配列を持つペプチド以外のペプチドは、配列番号1又は5で示されるアミノ酸配列と70%以上、さらに好ましくは90%以上の相同性を有していることが好ましい。また、これらのペプチドのアミノ酸数は特に限定されないが、合成の容易性や抗原性等の観点から、7個～20個程度が好ましく、さらに好ましくは7個～10個程度である。

上記した本発明の糖尿病治療薬の投与経路は、静脈内注射、筋肉内注射、経腸

投与などの非経口投与が好ましい。また、投与量は、患者の状態や有効成分の分子量等に基づき適宜決定されるが、通常、体重1 kg、1日当たり0.01 mg～1 mg程度が好ましい。また、治療薬は、常法により適宜製剤することができ、例えば、生理食塩水に30 mg/l～3000 mg/lの濃度範囲で溶解したもの用いることができる。

本願発明者は、上記と同様にして、インシュリンの産生を調節する(産生抑制又は促進)ペプチドを見出した。そのアミノ酸配列を配列表の配列番号2に示す。この配列は、上記本発明の探索方法に基づき、Glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptorのcDNA配列を比較することにより見出されたものである。インシュリンの産生を促進する場合には、上記と同様、糖尿病治療薬として有用であり、インシュリンの産生を抑制する場合には低血糖症等の治療薬として有用である。インシュリン産生調節剤として有用なペプチドは、配列番号2に示すアミノ酸配列を有するペプチドのみならず、配列番号2で示されるアミノ酸配列中の1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するペプチドであって、インシュリン産生細胞によるインシュリン生産を調節する効果を有するペプチドも本発明の範囲に含まれる。この場合、これらのペプチドは、配列番号2で示されるアミノ酸配列と70%以上、さらに好ましくは90%以上の相同性を有していることが好ましい。また、これらのペプチドのアミノ酸数は特に限定されないが、合成の容易性や抗原性等の観点から、28個～50個程度が好ましく、さらに好ましくは28個～35個程度である。

上記した本発明のインシュリン産生調節剤の投与経路は、静脈内注射、筋肉内注射、経腸投与などの非経口投与が好ましい。また、投与量は、患者の状態や有効成分の分子量等に基づき適宜決定されるが、通常、体重1 kg、1日当たり0.01 mg～1 mg程度が好ましい。また、治療薬は、常法により適宜製剤することができ、例えば、生理食塩水に30 mg/l～3000 mg/lの濃度範囲で溶解したものを用いることができる。

さらにまた、本願発明者は、上記と同様にして、胃酸分泌を調節(分泌抑制又は分泌促進)するペプチドを見出した。そのアミノ酸配列を配列表の配列番号3

及び4に示す。これらの配列は、上記本発明の探索方法に基づき、ガストリンレセプターのcDNA配列を比較することにより見出されたものである。このペプチドは、胃酸の分泌を調節するので、胃潰瘍及び十二指腸潰瘍治療薬等（分泌抑制の場合）として、又は胃酸分泌過小症治療薬（分泌促進の場合）として有用である。  
5 胃酸分泌調節剤として有用なペプチドは、配列番号3又は4に示すアミノ酸配列を有するペプチドのみならず、配列番号3又は4で示されるアミノ酸配列中の1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するペプチドであって、胃酸分泌を調節する効果を有するペプチドも本発明の範囲に含まれる。この場合、これらのペプチドは、配列番号3又は4で示されるア  
10 ミノ酸配列と70%以上、さらに好ましくは90%以上の相同性を有していることが好ましい。また、これらのペプチドのアミノ酸数は特に限定されないが、合成の容易性や抗原性等の観点から、配列番号3で示されるものについては5個～  
20 個程度が好ましく、さらに好ましくは5個～8個程度であり、配列番号4で示されるものについては11個～30個程度が好ましく、さらに好ましくは11個～20個程度である。  
15

上記した本発明の胃酸分泌調節剤の投与経路は、静脈内注射、筋肉内注射、経腸投与などの非経口投与が好ましい。また、投与量は、患者の状態や有効成分の分子量等に基づき適宜決定されるが、通常、体重1kg、1日当たり0.01mg～1mg程度が好ましい。また、胃酸分泌調節剤は、常法により適宜製剤する  
20 ことができ、例えば、生理食塩水に30mg/l～3000mg/lの濃度範囲で溶解したものを用いることができる。

さらにまた、本願発明者は、成長ホルモン生産を調節（生産促進又は生産抑制）するペプチドを見出した。そのアミノ酸配列を配列表の配列番号6に示す。このペプチドは、成長ホルモンの生産を調節するので小人症の治療薬等（生産促進の場合）又は巨人症治療薬（生産抑制の場合）として有用である。成長ホルモン生産調節剤として有用なペプチドは、配列番号6に示すアミノ酸配列を有するペ  
25 プチドのみならず、配列番号6で示されるアミノ酸配列中の1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するペプチドであって、

成長ホルモン分泌を促進する効果を有するペプチドも本発明の範囲に含まれる。この場合、これらのペプチドは、配列番号6で示されるアミノ酸配列と70%以上、さらに好ましくは90%以上の相同性を有していることが好ましい。また、これらのペプチドのアミノ酸数は特に限定されないが、合成の容易性や抗原性等の観点から、配列番号6で示されるものについては12個～30個程度が好ましく、さらに好ましくは12個～20個程度である。

上記した本発明の成長ホルモン生産調節剤の投与経路は、静脈内注射、筋肉内注射、経腸投与などの非経口投与が好ましい。また、投与量は、患者の状態や有効成分の分子量等に基づき適宜決定されるが、通常、体重1kg、1日当たり0.01mg～1mg程度が好ましい。また、成長ホルモン生産調節剤は、常法により適宜製剤することができ、例えば、生理食塩水に30mg／1～3000mg／1の濃度範囲で溶解したものを用いることができる。

### 実施例

以下、実施例により本発明をより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

#### 実施例1 グルカゴンレセプターの生理活性ペプチドの予測

FEBS Letters 351 (1994) 271-275に記載されたラットグルカゴンレセプターのアミノ酸配列を検討した。グルカゴンレセプターはcDNAの塩基配列から4つの長さの種類のcDNAが報告され、この中でアミノ酸に翻訳可能なものとして、2つが明らかにされている。これは転写後のスプライシングが異なっているものであり、カルシトニンレセプターの場合のような翻訳後のスプライシングとは様式が異なっている。しかしながら、本願発明者はこのように転写後の異なるスプライシングによって生じるアミノ酸部分も何らかの活性を有していると予測した。このアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。

#### 実施例2 ペプチドの製造

市販のペプチド合成機を用い、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するペプチドを合成した。

#### 実施例3 インシュリン分泌促進作用

インシュリン産生細胞である、ヒト臍臓由来のBxPC-3細胞(入手先：大日本製薬)を10%牛胎児血清を含むRPMI1640培地(入手先：大日本製薬)にて培養し、5%炭酸ガス加湿37°C恒温器内にて育成した。トリプシン処理により、 $1 \times 10^5$ /well蒔種し、コンフルーエントになったところで実施例2で合成した本発明のペプチド、本発明に無関係であり活性が明らかではないペプチドA、B、及びコントロール(生理食塩水)を0.01mg/well加え24時間培養した。その後、上清に含まれるインシュリン濃度をインシュリン測定キット(入手先：シバヤギ)にて比色定量した。結果を下記表1に示す。

表1

試料	インシュリン濃度( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
本発明ペプチド	148
コントロール	37.6
ペプチドA	34.8
ペプチドB	87.1

表1から明らかなように、本発明の方法により探索された上記ペプチドは、インシュリン産生細胞BxPC-3細胞に対して、インシュリン産生を促進することが確認された。従って、本ペプチドはインシュリンの合成の作用により、糖尿病患者に対して有効に働くことがわかった。

#### 実施例4 ペプチドの製造

市販のペプチド合成機を用い、ヒトのグルカゴンレセプターのcDNA配列を基に予測された配列番号1及び5に示されるアミノ配列を有するペプチドを合成した。

#### 実施例5 インシュリン産生細胞のインシュリン生産促進

インシュリンを産生するハムスター臍臓細胞であるHIT細胞、ヒト臍臓細胞であるBxPC-3細胞(入手先：大日本製薬)を10%牛胎児血清を含むRPMI1640培地(入手先：大日本製薬)にて培養し、5%炭酸ガス加湿37°C恒温器内にて育成した。トリプシン処理により96穴培養プレートに $1 \times 10^4$ 個/穴(well)蒔種し、コンフルーエントになったところで培地を無血清F12培地に交換し、8時間培養した。その後、実施例4で製造した本発明のペプチドを無血清RPMI1640培地に溶解し、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するペプチドをHIT細胞

に、配列番号 5 で示されるアミノ酸配列を有するペプチドを BxPC-3 細胞に用量変化をさせながら well に加えてさらに 12 時間培養を継続した。培養後、本ペプチドによる細胞のインシュリン産生促進効果をインシュリンのイムノアッセイにより測定し、非処理群に対する産生促進効果を求めた。なお、インシュリンのイムノアッセイ及びインシュリン産生促進率の算出は具体的には次のように行った。シバヤギ（株）より市販されているインシュリン測定キットの手順に従い、細胞培養液上清を容量変化させながら抗インシュリン抗体が固定されたウェルに加え抗インシュリン抗体溶液と反応させた。検出は、抗体に標識されたビオチンをストレプトアビジン結合ペルオキシダーゼと反応させ、ペルオキシダーゼによる発色を測定した。インシュリン濃度は、インシュリンの標準曲線から算出した。インシュリン産生促進率は本物質を加えない対照群を 100% とし用量を変化させて加えた群のインシュリン生産促進率を求めるべく次のように成了した。結果を下記表 2 に示す。

表 2

ペプチド添加量 ( $\mu\text{g}/\text{well}$ )	インシュリン産生促進率 (%)	
	HIT 細胞	BxPC-3 細胞
0	100.0	100.0
0.01	102.8	110.9
0.1	131.6	123.3
1	184.9	198.2
10	203.1	181.1

表 2 から明らかなように、本発明の方法により探索された上記ペプチドは、ハムスター、ヒト由来インシュリン産生細胞に対しインシュリン産生促進的に作用することが確認された。従って、本ペプチドは血糖値低下に結びつくものと考えられ、糖尿病等の治療に対し有用である。

#### 実施例 6 ペプチドの製造

市販のペプチド合成機を用い、ガストリンレセプターの cDNA 配列を比較することにより予測された配列番号 3 及び 4 に示されるアミノ酸配列を有するペプチドを合成した。

#### 実施例 7 ラットにおける胃酸分泌抑制効果

胃酸分泌抑制効果は、ラット（ウィスター種）を用い、実施例 6 で合成したペ

5 プチドと胃酸分泌を促進するガストリンを生理食塩水に溶解した溶液を皮下注射し、10分後の胃酸分泌を測定することで評価した。ガストリンは4 μg/kgになるよう、本発明のペプチドは10 μg/kgとなるよう投与した。胃酸分泌は、ラットを固定器に固定し口よりゾンデを胃に入れ胃液を採取し、そのpHを測定することで評価した。胃酸分泌抑制は本物質を投与しない対照群と、投与群の胃酸分泌を比べると次のようになった。結果を下記表3に示す。

表3

	胃酸分泌(pH)	
	配列番号3	配列番号4
コントロール	3.2	3.1
投与群	5.3	4.8

10 表3から明らかなように、本発明の方法により探索された上記ペプチドは、ラットに対し胃酸分泌抑制的に作用することが確認された。従って、本ペプチドは胃酸分泌を抑制する胃潰瘍及び十二指腸潰瘍治療薬として有用である。

#### 実施例8 ペプチドの合成

ソマトスタチンレセプターのアミノ酸配列を比較することにより予測された配列番号6に示すアミノ酸配列を有するペプチドを市販のペプチド合成機により合成した。

#### 15 実施例9 成長ホルモン産生細胞の成長ホルモン生産促進

成長ホルモンを産生する脳下垂体細胞であるハムスター由来G H 3細胞（入手先：I F O（受託番号50105）を15%牛胎児血清を含むF 12培地（入手先：大日本製薬）にて培養し、5%炭酸ガス加湿37°C恒温器内にて育成した。トリプシン処理により96穴培養プレートに $1 \times 10^4$ 個／穴(well)蒔種し、コンフルエントになったところで培地を15%血清F 12培地に交換し、12時間培養した。その後、実施例7で製造した本発明のペプチドを15%血清F 12培地に溶解し、用量変化をさせながらwellに加えてさらに3日間培養を継続した。培養後、本ペプチドによる細胞の成長ホルモン産生促進効果を成長ホルモンのイムノアッセイにより測定し、非処理群に対する産生促進効果を求めた。なお、成長ホルモンのイムノアッセイは、常法であるサンドイッチELISAにより行った。すなわち、抗成長ホルモン抗体が固定されたウェルに、細胞培養液上清を用量変

化させながら加え、室温で180分間反応させ、洗浄後、さらにペルオキシダーゼ標識した抗成長ホルモン抗体を加え、室温で60分間反応させた。洗浄後、ペルオキシダーゼによる発色反応を吸光度測定により測定した。成長ホルモン濃度は、既知濃度の成長ホルモンを用いて同じサンドイッチELISAを行って得られた標準曲線に基づき求めた。成長ホルモン産生促進率は、ペプチドを加えない対照群を100%年、用量を変化させて加えた群の成長ホルモン産生促進率を求めるべく次のようになった。結果を下記表4に示す。

表4

ペプチド添加量 ( $\mu$ g/well)	成長ホルモン産生促進率 (%)
0	100.0
0.01	101.2
0.1	124.1
1	175.6
10	190.4

表4から明らかなように、実施例8で作製されたペプチドは、成長ホルモン産生細胞に対し成長ホルモン産生促進的に作用することが確認された。従って、本ペプチドは成長促進に結びつくものと考えられ、小人病等の治療に有用である。

## 請求の範囲

1. 生体内の物質に拮抗作用を示す物質を產生する細胞のレセプター、又は該細胞自体に対して拮抗作用を有する物質を產生する細胞のレセプターにおいて、同一のレセプターのアミノ酸配列について2種類以上のサイズのものが存在するものを、該レセプターのcDNAの配列を比較することにより調べ、かつ長いレセプターのどの領域が短いレセプターにおいて欠失しているかを上記cDNAの配列を比較することにより調べることを含む、生理活性物質の探索方法。
2. 請求項1記載の方法により判明した欠失領域又はその誘導体を作製することから成る、生理活性ペプチドの製造方法。
3. 上記欠失領域を作製することから成る、請求項2記載の方法。
4. 前記欠失領域を化学合成により合成する請求項3記載の方法。
5. 配列表の配列番号1又は5で示されるアミノ酸配列を有するペプチド又は該配列中の1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するペプチドであって、インシュリン產生細胞によるインシュリン生産を増大させる効果を有するペプチドを有効成分として含有する糖尿病治療薬。
6. 配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するペプチドを有効成分として含有する請求項5記載の糖尿病治療薬。
7. 配列表の配列番号5で示されるアミノ酸配列を有するペプチドを有効成分として含有する請求項5記載の糖尿病治療薬。
8. 配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するペプチド又は該配列中の1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するペプチドであって、インシュリン产生細胞によるインシュリン生産を調節できる効果を有するペプチドを有効成分として含有する、インシュリン产生調節剤。
9. 配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するペプチドを有効成分として含有する請求項8記載のインシュリン产生調節剤。
10. インシュリン产生抑制剤である請求項8又は9記載のインシュリン产生調節剤。
11. 糖尿病治療薬である請求項8又は9記載のインシュリン产生調節剤。

12. 配列表の配列番号3又は4で示されるアミノ酸配列を有するペプチド又は該配列中の1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するペプチドであって、胃酸分泌を調節できる効果を有するペプチドを有効成分として含有する、胃酸分泌調節剤。

5 13. 配列表の配列番号3又は4で示されるアミノ酸配列を有するペプチドを有効成分として含有する請求項12記載の胃酸分泌調節剤。

14. 胃酸分泌抑制剤である請求項12又は13記載の胃酸分泌調節剤。

10 15. 配列表の配列番号6で示されるアミノ酸配列を有するペプチド又は該配列中の1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するペプチドであって、成長ホルモンの生産を調節できる効果を有するペプチドを有効成分として含有する、成長ホルモン生産調節剤。

16. 配列表の配列番号6で示されるアミノ酸配列を有するペプチドを有効成分として含有する請求項15記載の成長ホルモン生産調節剤。

15 17. 成長ホルモン生産促進剤である請求項15又は16記載の成長ホルモン生産調節剤。

## SEQUENCE LISTING

<110> SAKAMOTO Kenji and NAKOSHI Hideo

<120> Methods For Searching or Producing Physiologically Active Substances and Pharmaceuticals Discovered by the Method

5 <130> 99599

<160> 6

<210> 1

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Polypeptide having inhibitory effect for insulin production

<400> 1

Pro Lys Ala Pro Ser Ala Gln

15 1 5

<210> 2

<211> 28

<212> PRT

20 <213> Artificial Sequence

<223> Polypeptide having regulatory effect for insulin production

<400> 2

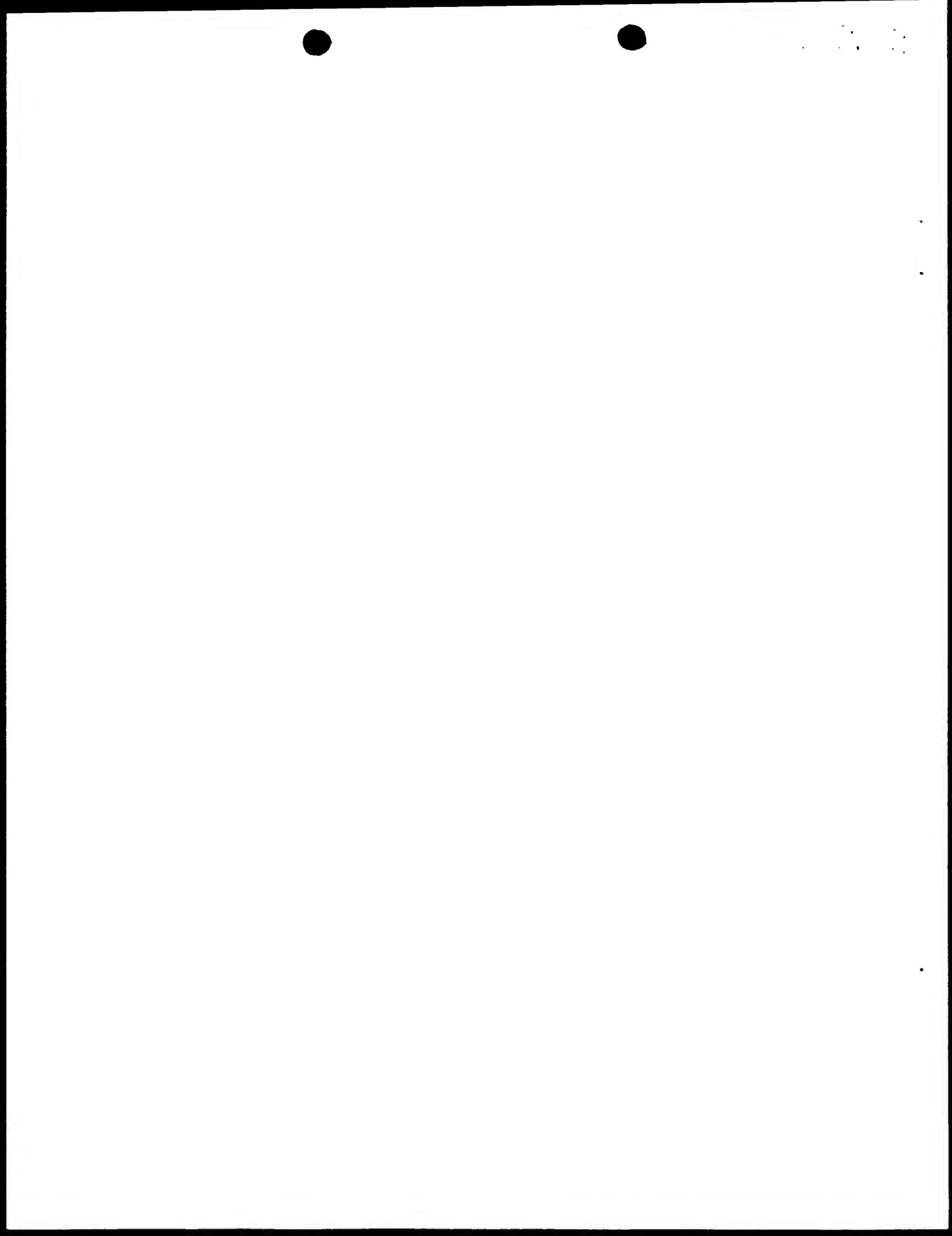
Val Gly Arg Asp Pro Ala Ala Ala Pro Ala Leu Trp Arg Arg Arg Gly

1 5 10 15

25 Thr Ala Pro Pro Leu Ser Ala Ile Val Ser Gln Val

20 25

<210> 3



<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Polypeptide having inhibitory effect for gastric acid secretion

5 <400> 3

Gly Gly Ala Gly Pro

1 5

<210> 4

10 <211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Polypeptide having inhibitory effect for gastric acid secretion

<400> 4

15 Met Ser Val Gly Gly Asn Met Leu Ile Ile Val

1 5 10

<210> 5

<211> 7

20 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Polypeptide having inhibitory effect for insulin production

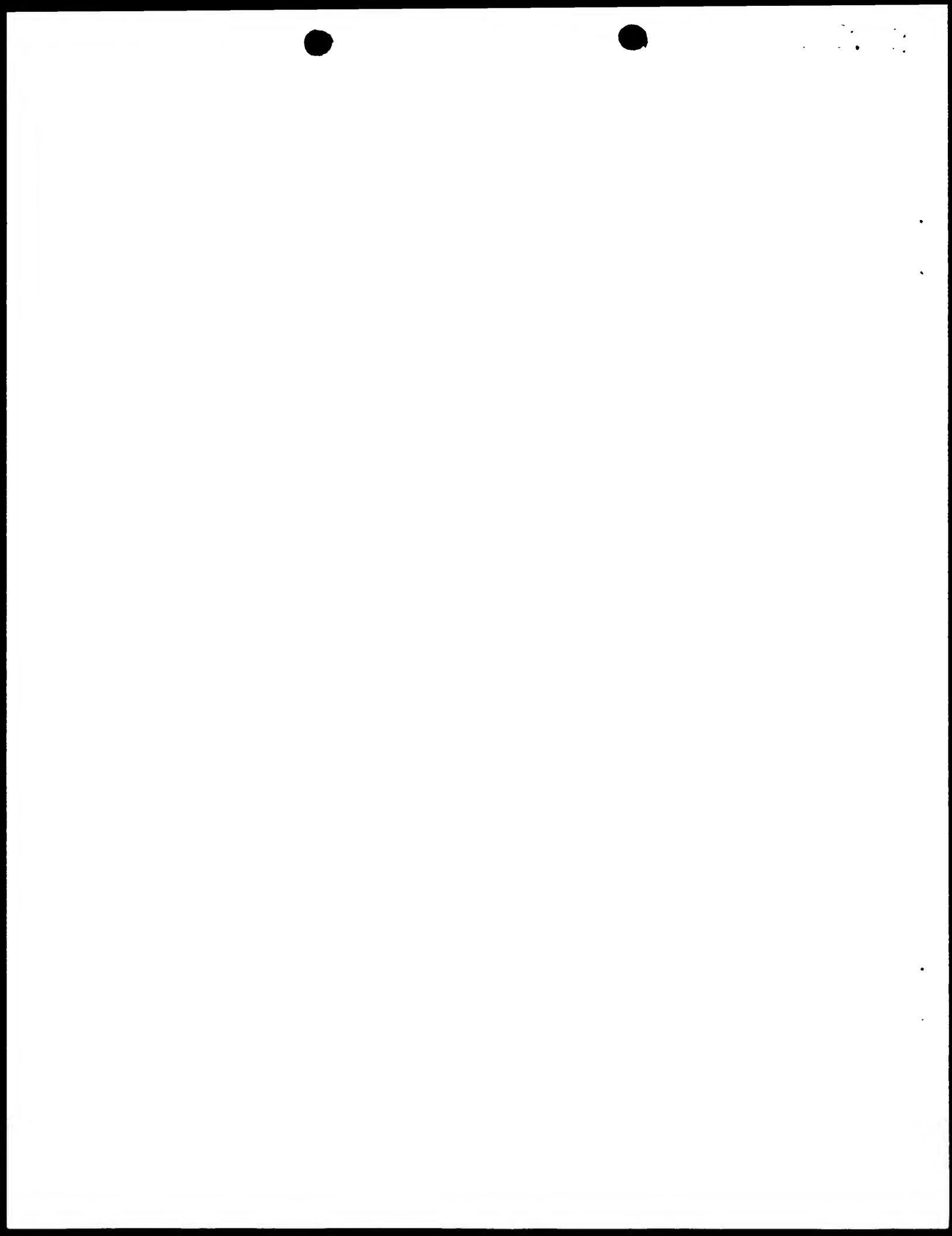
<400> 5

Pro Gln Val Pro Ser Ala Gln

25 1 5

<210> 6

<211> 7



<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Polypeptide having promotive effect for growth hormone secretion

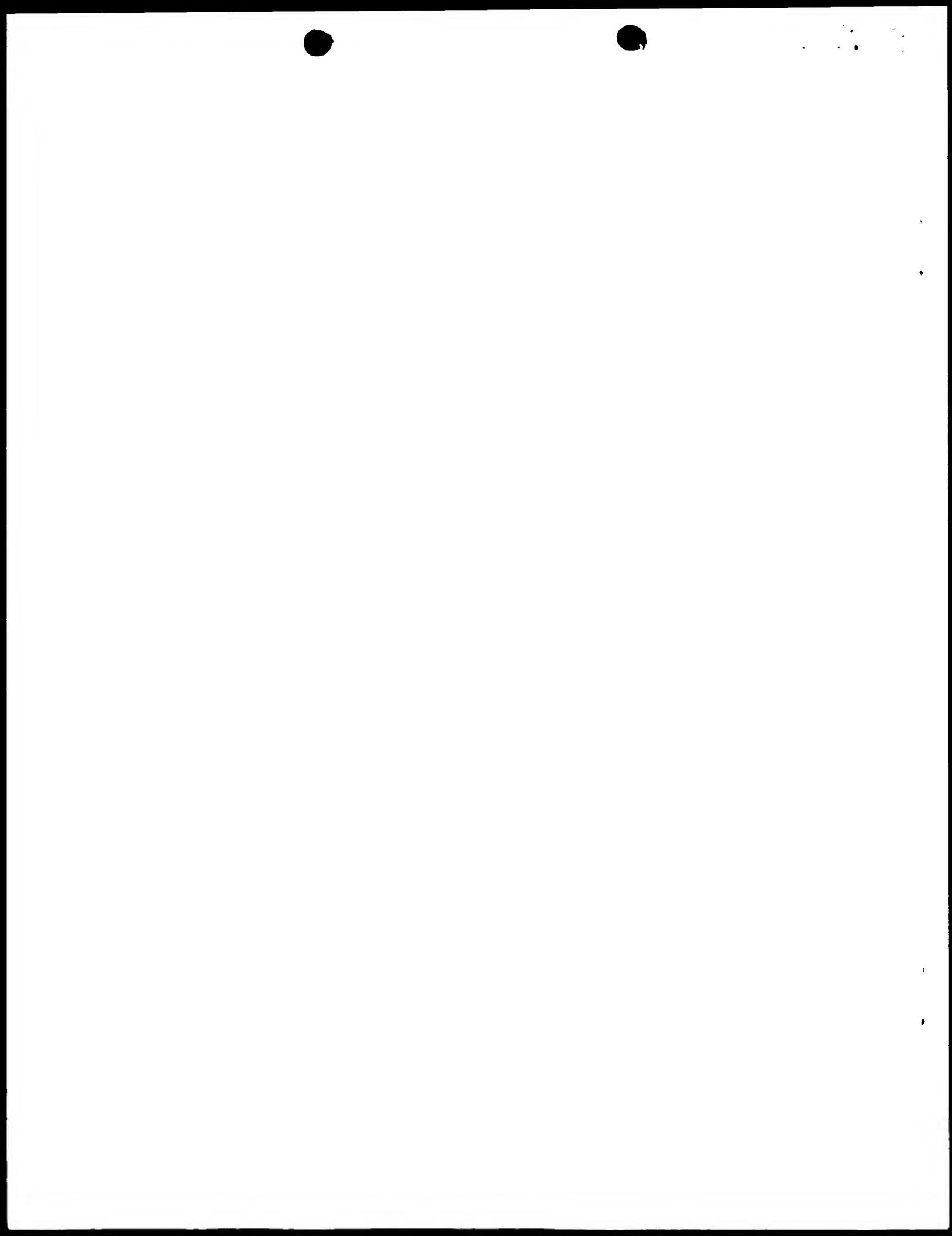
<400> 6

5 Pro Ser Cys Gln Trp Val Gln Ala Pro Ala Cys Gln

1

5

10



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01796

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl° C07K7/06, A61K38/26, A61K38/30, A61K38/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl° C07K7/06, A61K38/26, A61K38/30, A61K38/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN) WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),  
GenBank/EMBL/DDBJ, SwissProt/PIR/GeneSeq

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X P, Y	JP, 10-109997, A (Kenji Sakamoto), 28 April, 1998 (28. 04. 98) & WO, 98/14479, A1 & AU, 9744707, A	1-4 5-17
X Y	NARANDA, T. et al., "A peptide derived from an extracellular domain selectively inhibits receptor internalization: target sequences on insulin and insulin-like growth factor 1 receptors", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) Vol. 94, No. 21, p.11692-11697	1-4 5-17
X Y	JONCA, F. et al., "Cell release of bioactive fibroblast growth factor 2 by exon 6-encoded sequence of vascular endothelial growth factor", J. Biol. Chem. (1997) Vol. 272, No. 39, p.24203-24209	1-4 5-17
Y	MAGET, B. et al., "Sequencing of eleven introns in genomic DNA encoding rat glucagon receptor and multiple alternative splicing of its mRNA", FEBS Lett. (1994) Vol. 351, No. 2, p.271-275	5-6

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 30 June, 1999 (30. 06. 99)	Date of mailing of the international search report 13 July, 1999 (13. 07. 99)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
--	--------------------

Facsimile No.	Telephone No.
---------------	---------------

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP99/01796
---

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LOK, S. et al., "The human glucagon receptor encoding gene: structure, cDNA sequence and chromosomal localization", Gene (1994) Vol. 140, No. 2, p.203-209	5, 7
Y	GREMLICH, S. et al., "Cloning, functional expression, and chromosomal localization of the human pancreatic islet glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor", Diabetes (1995) Vol. 44, No. 10, p.1202-1208	8-11
Y	SONG, I. et al., "The human gastrin/cholecystokinin type B receptor gene: alternative splice donor site in exon 4 generates two variant mRNAs", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) Vol. 90, No. 19, p.9085-9089	12-14
Y	ITO, M. et al., "Functional characterization of two cholecystokinin-B/gastrin receptor isoforms: a preferential splice donor site in the human receptor gene", Cell Growth Differ. (1994) Vol. 5, No. 10, p.1127-1135	12-14
Y	REISINE, T. et al., "Splice variant of the somatostatin receptor 2 subtype, somatostatin receptor 2B, couples to adenylyl cyclase", Mol. Pharmacol. (1993) Vol. 44, No. 5, p.1016-1020	15-17
A	NUSSENZVEIG, D.R. et al., "Inhibition of inositol phosphate second messenger formation by intracellular loop one of a human calcitonin receptor. Expression and mutational analysis of synthetic receptor genes", J. Biol. Chem. (1994) Vol. 269, No. 45, p.28123-28129	1-17

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/01796

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(I.P.C.))

Int.Cl<sup>a</sup> C07K 7/06, A61K 38/26, A61K 38/30, A61K 38/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(I.P.C.))

Int.Cl<sup>a</sup> C07K 7/06, A61K 38/26, A61K 38/30, A61K 38/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY(STN), CA(STN), MEDLINE(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), GenBank/EMBL/DDB/J, SwissProt, PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリーや*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X P, Y	JP, 10-109997, A (坂本 賢二) 28.4月.1998 (28.04.98) & WO, 98/14479, A1 & AU, 9744707, A	1-4 5-17
X Y	NARANDA, T. et al. "A peptide derived from an extracellular domain selectively inhibits receptor internalization:target sequences on insulin and insulin-like growth factor 1 receptors", Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1997)Vol. 94, No. 21, p. 11692-11697	1-4 5-17
X Y	JONCA, F. et al. "Cell release of bioactive fibroblast growth factor 2 by exon 6-encoded sequence of vascular endothelial growth factor", J. Biol. Chem. (1997)Vol. 272, No. 39, p. 24203-24209	1-4 5-17

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 ハテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であつて出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するも

「X」特に関連のある文献であつて、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であつて、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一ハテントファミリー文献

国際調査を完了した日 30.06.99	国際調査報告の発送日 <b>13.07.99</b>	
国際調査機関の名称及びお問い合わせ先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許序審査官(権限のある職員) 高堀 栄二 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 9281 

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/01796

C(続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	MAGET, B. et al. "Sequencing of eleven introns in genomic DNA encoding rat glucagon receptor and multiple alternative splicing of its mRNA", FEBS Lett. (1994) Vol. 351, No. 2, p. 271-275	5-6
Y	LOK, S. et al. "The human glucagon receptor encoding gene: structure, cDNA sequence and chromosomal localization", Gene (1994) Vol. 140, No. 2, p. 203-209	5, 7
Y	GREMLICH, S. et al. "Cloning, functional expression, and chromosomal localization of the human pancreatic islet glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor", Diabetes (1995) Vol. 44, No. 10, p. 1202-1208	8-11
Y	SONG, I. et al. "The human gastrin/cholecystokinin type B receptor gene: alternative splice donor site in exon 4 generates two variant mRNAs", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) Vol. 90, No. 19, p. 9085-9089	12-14
Y	ITO, M. et al. "Functional characterization of two cholecystokinin-B/gastrin receptor isoforms: a preferential splice donor site in the human receptor gene", Cell Growth Differ. (1994) Vol. 5, No. 10, p. 1127-1135	12-14
Y	REISINE, T. et al. "Splice variant of the somatostatin receptor 2 subtype, somatostatin receptor 2B, couples to adenylyl cyclase", Mol. Pharmacol. (1993) Vol. 44, No. 5, p. 1016-1020	15-17
A	NUSSENZVEIG, D. R. et al. "Inhibition of inositol phosphate second messenger formation by intracellular loop one of a human calcitonin receptor. Expression and mutational analysis of synthetic receptor genes", J. Biol. Chem. (1994) Vol. 269, No. 45, p. 28123-28129	1-17

## 特許協力条約

PCT

## 国際予備審査報告

REC'D 25 APR 2000

WFO

PCT

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 99PF182-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/01796	国際出願日 (日.月.年) 05.04.99	優先日 (日.月.年) 04.04.98
国際特許分類 (IPC) Int.C1' C07K 7/06, A61K 38/26, A61K 38/30, A61K 38/00		
出願人（氏名又は名称） 坂本 賢二		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。

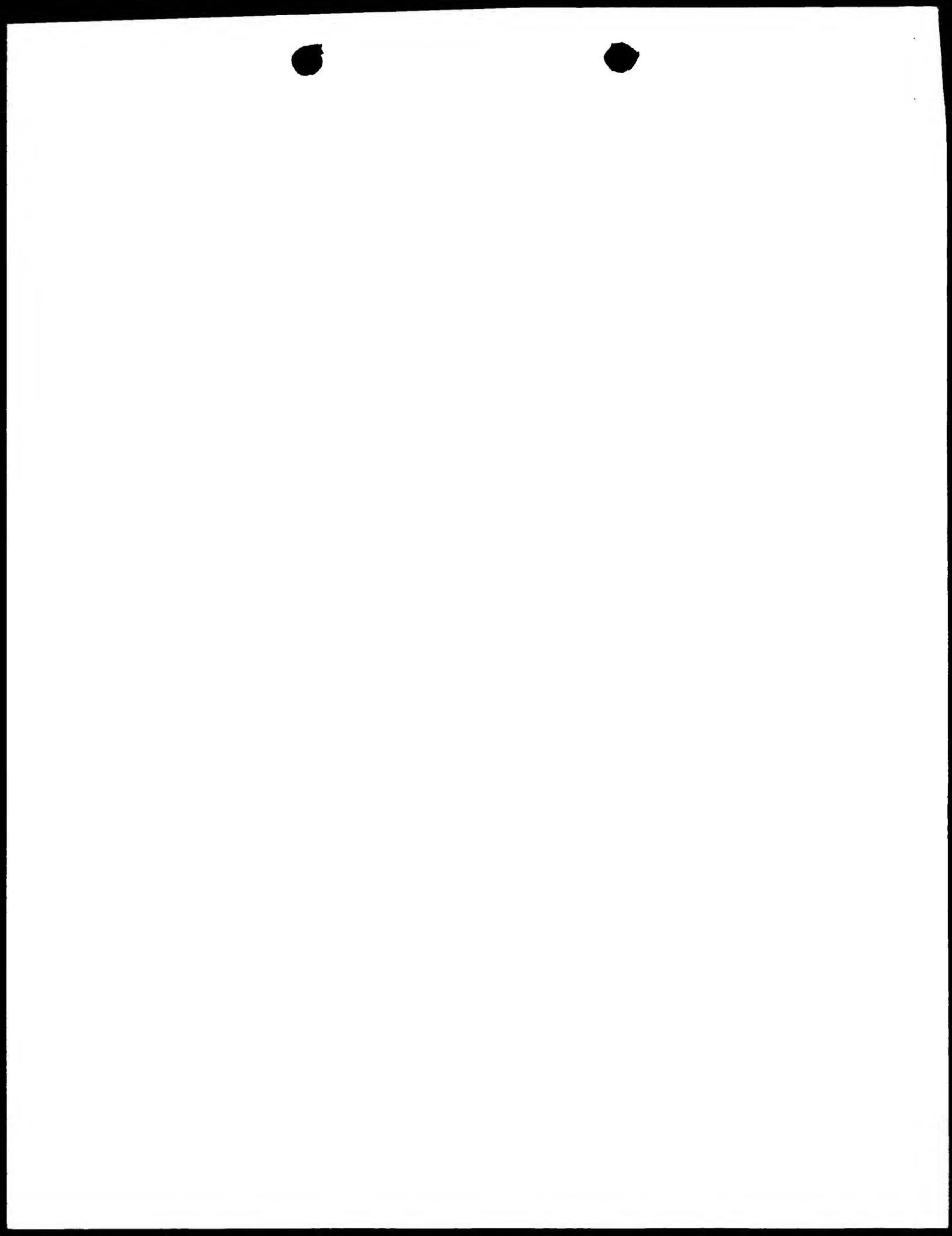
この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対して訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)

この附属書類は、全部で \_\_\_\_\_ ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I  国際予備審査報告の基礎
- II  優先権
- III  新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV  発明の単一性の欠如
- V  PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI  ある種の引用文献
- VII  国際出願の不備
- VIII  国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 02.11.99	国際予備審査報告を作成した日 05.04.00
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 高堀 栄二 電話番号 03-3581-1101 内線 3448
	4B 9281



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。PCT規則70.16, 70.17)

 出願時の国際出願書類

<input type="checkbox"/> 明細書	第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書	第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書	第 _____	ページ、	
<input type="checkbox"/> 請求の範囲	第 _____	項、	出願時に提出されたもの PCT19条の規定に基づき補正されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲	第 _____	項、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲	第 _____	項、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲	第 _____	項、	
<input type="checkbox"/> 図面	第 _____	ページ/図、	出願時に提出されたもの 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面	第 _____	ページ/図、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面	第 _____	ページ/図、	
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分	第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分	第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分	第 _____	ページ、	

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- 國際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
 PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

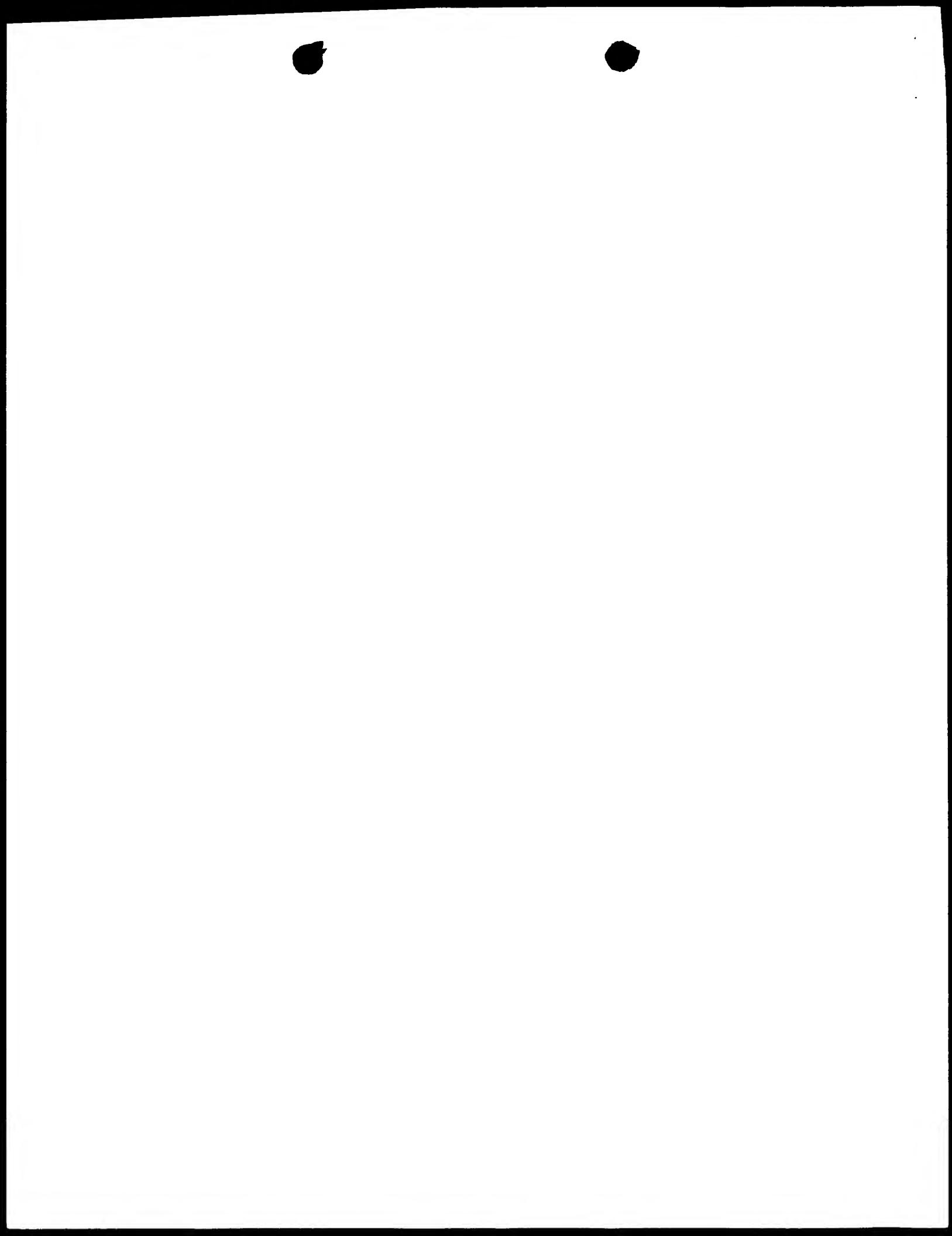
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- この国際出願に含まれる書面による配列表  
 この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5.  この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかつたものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条 (PCT35条(2)) に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲 請求の範囲	1-17	有 無
進歩性 (IS)	請求の範囲 請求の範囲	1-17	有 無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲 請求の範囲	1-17	有 無

## 2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲 1-4 は、国際調査で引用された文献 1 (NARANDA, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) Vol. 94, No. 21, p. 11692-11697) 又は文献 2 (JONCA, F. et al., J. Bio. Chem. (1997) Vol. 272, No. 39, p. 24203-24209) により進歩性を有しない。

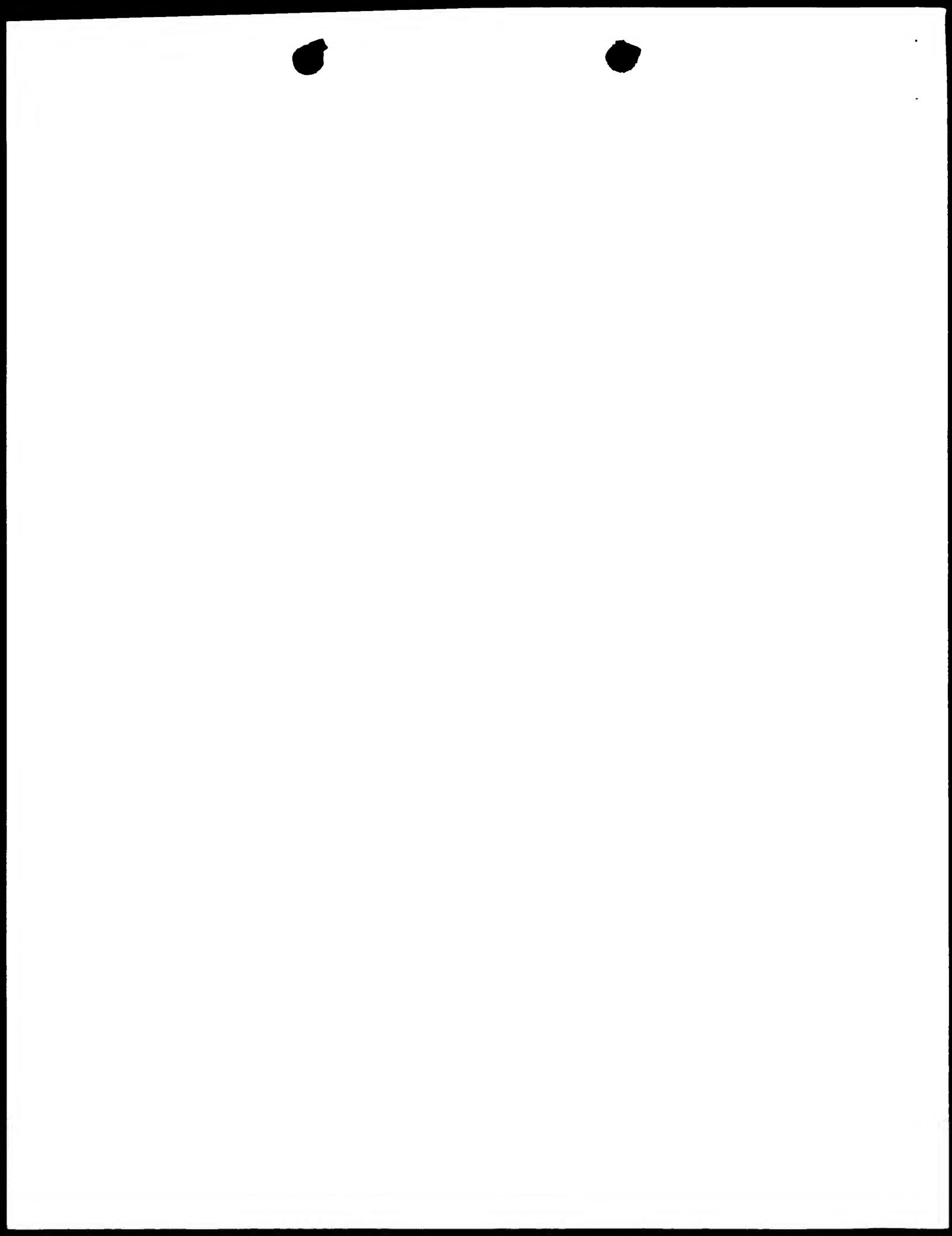
文献 1 には、同一のレセプターにつき 2 種類以上のサイズのものが存在し、その欠失部分のアミノ酸配列からなるペプチドが生理活性を有することが記載されている。文献 2 には、同一の生理活性を有するタンパク質につき 2 種類以上のサイズのものが存在し、その欠失部分のアミノ酸配列からなるペプチドが生理活性を有することが記載されている。

したがって、文献 1、2 の記載を基にして、生体内の物質に拮抗作用を示す物質を产生する細胞のレセプター又は該細胞自体に対して拮抗作用を有する物質を生産する細胞のレセプターをコードする cDNA について、2 種類以上の cDNA の配列を比較し、欠失している部分に相当するアミノ酸配列からなるペプチドを合成し、該ペプチドが生理活性を有することを調べることにより、生理活性物質を探索することは、当業者が容易に想到し得ることと認められる。

請求の範囲 5-17 は、文献 1、文献 2、文献 3 (MAGET, B. et al., FEBS Lett. (1994) Vol. 351, No. 2, p. 271-275)、文献 4 (LOK, S. et al., Gene (1994) Vol. 140, No. 2, p. 203-209)、文献 5 (GREMLICH, S. et al., Diabetes (1995) Vol. 44, No. 10, p. 1202-1208)、文献 6 (SONG, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) Vol. 90, No. 19, p. 9085-9089)、文献 7 (ITO, M. et al., Cell Growth Differ. (1994) Vol. 5, No. 10, p. 1127-1135) 及び文献 8 (REISINE, T. et al., Mol. Pharmacol. (1993) Vol. 44, No. 5, p. 1016-1020) により進歩性を有しない。

文献 3 には、ラットグルカゴンレセプターをコードする 2 種類以上の cDNA、文献 4 には、ヒトグルカゴンレセプターをコードする DNA、引用例 5 には、グルコインス依存性インシュリノトロピックポリペプチドレセプターをコードする DNA、引用例 6、7 には、ガストリンレセプターをコードする 2 種類の cDNA、文献 8 には、ソマトスタチンレセプターをコードする 2 種類以上の cDNA が記載されている。

したがって、文献 1、2 の記載を基にして、文献 3~8 に記載されているレセプターをコードする cDNA について、2 種類以上の cDNA の配列を比較し、欠失している部分に相当するアミノ酸配列からなるペプチドを合成し、該ペプチドの生理活性を調べて、該ペプチドを医薬として使用することは、当業者が容易に想到し得ることと認められる。



## VI. ある種の引用文献

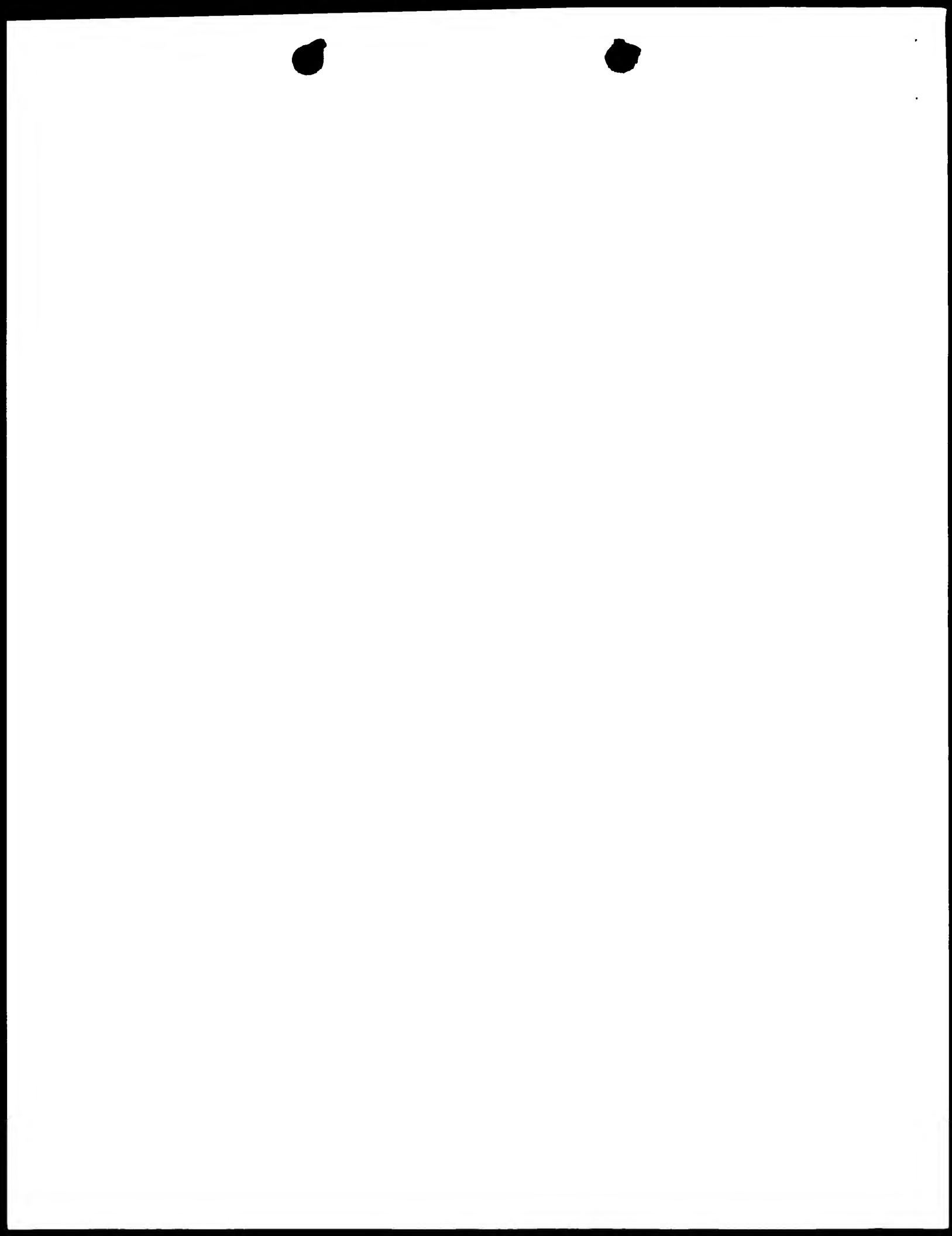
## 1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日、月、年)	出願日 (日、月、年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日、月、年)
--------------	----------------	----------------	----------------------------

JP, 10-109997, A 「P, X/P, Y」	28. 04. 98	02. 10. 96	
---------------------------------	------------	------------	--

## 2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日、月、年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日、月、年)
-----------------	----------------------------	--------------------------------------



5647  
Translation

16C1  
PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

RECEIVED

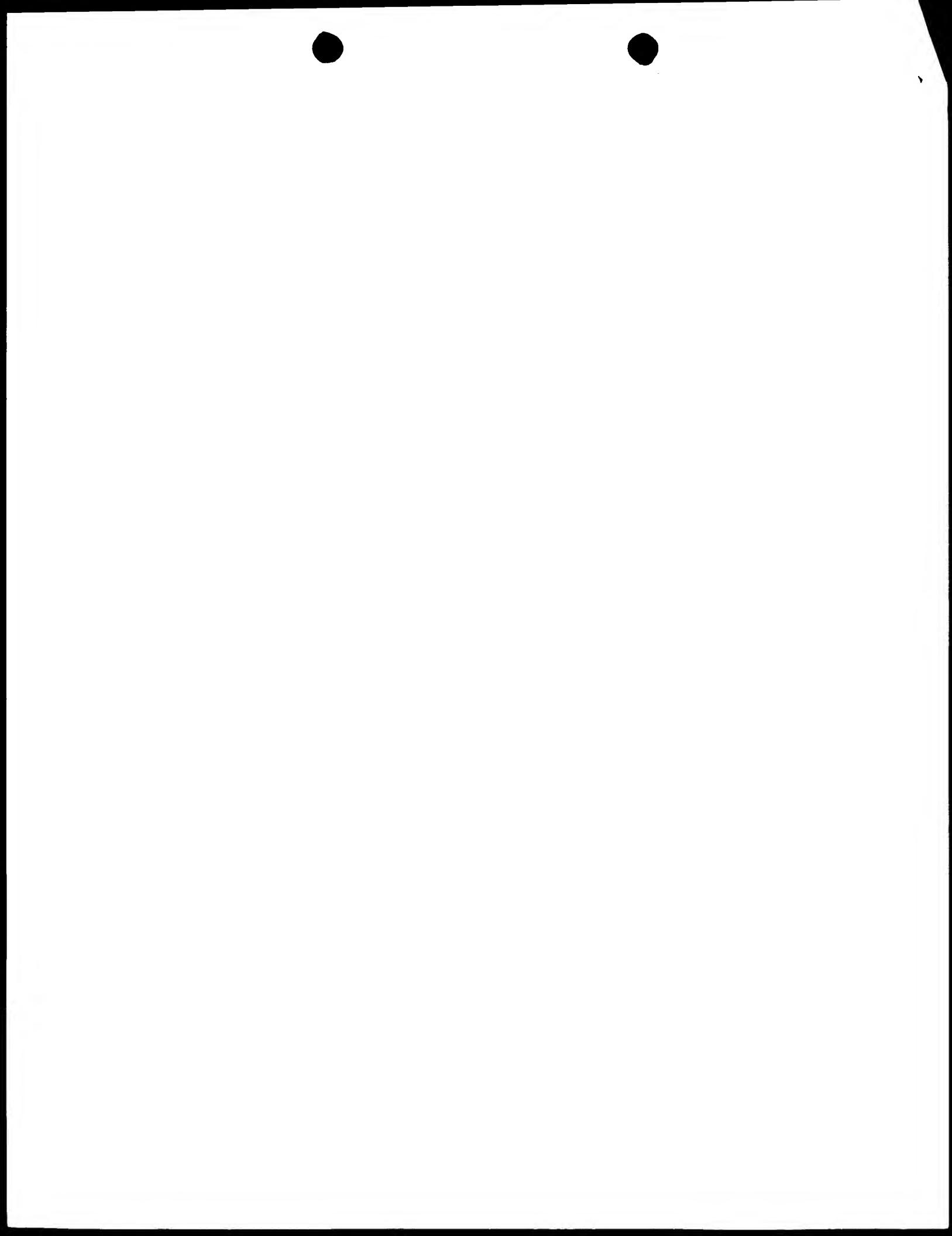
(PCT Article 36 and Rule 70)

JAN 11 2000

Applicant's or agent's file reference <b>99PF182-PCT</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b> SeeNotificationofTransmittalofInternational Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. <b>PCT/JP99/01796</b>	International filing date (day month year) <b>05 April 1999 (05.04.99)</b>	Priority date (day month year) <b>04 April 1998 (04.04.98)</b>
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC <b>C07K 7/06, A61K 38/26, 38/30, 38/00</b>		
Applicant	<b>SAKAMOTO, Kenji</b>	

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.
<input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:  I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand <b>02 November 1999 (02.11.99)</b>	Date of completion of this report <b>05 April 2000 (05.04.2000)</b>
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/01796

## I. Basis of the report

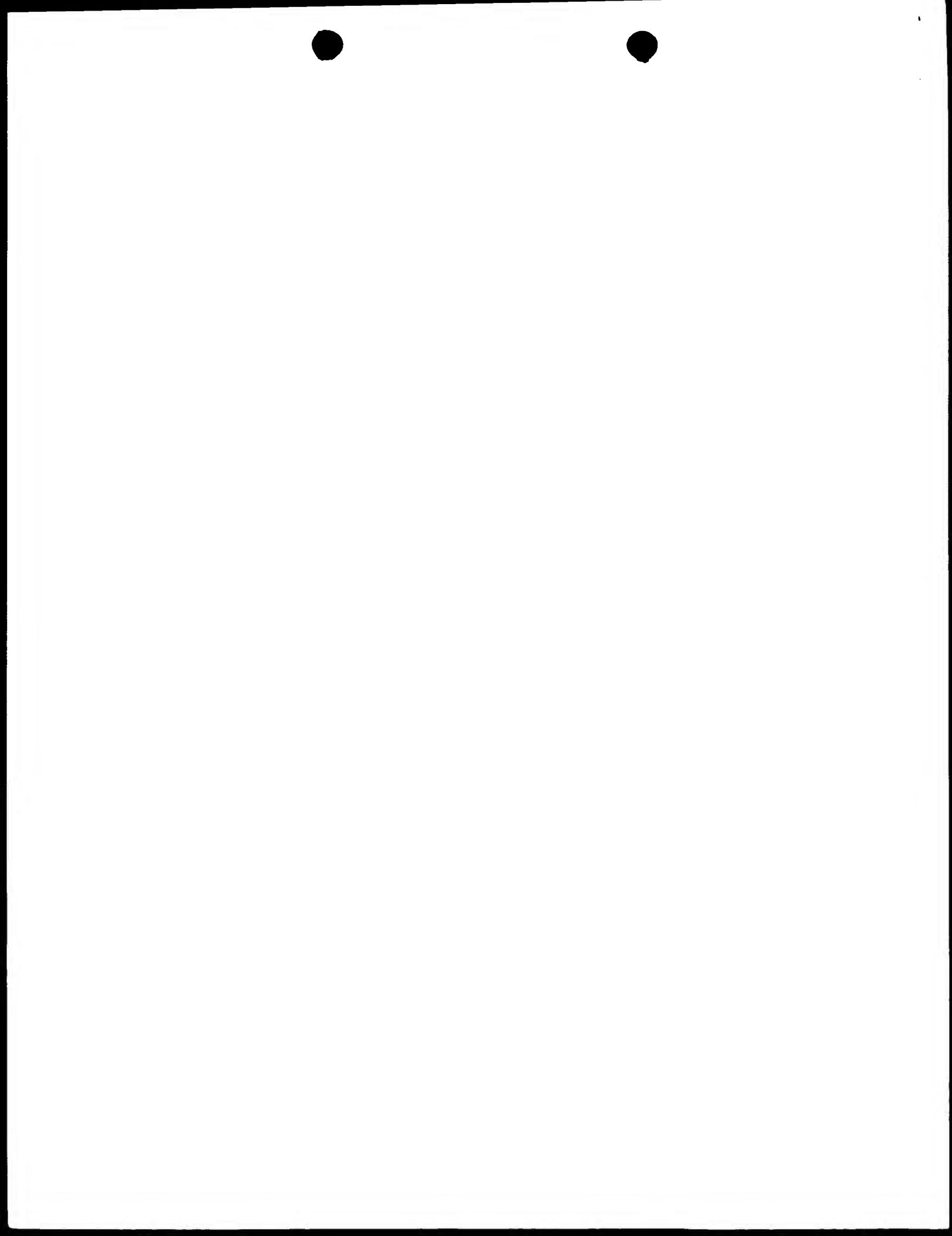
1. With regard to the elements of the international application:<sup>\*</sup> the international application as originally filed the description:pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_ the claims:pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19)  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_ the drawings:pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_ the sequence listing part of the description:pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.  
These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is: the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

## 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

 contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4.  The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages \_\_\_\_\_ the claims, Nos. \_\_\_\_\_ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_5.  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).<sup>\*\*</sup>

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/01796

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-17	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-17	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-17	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

The subject matters of claims 1-4 do not appear to involve an inventive step in view of document 1 [Naranda, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA (1997), Vol. 94, No. 21, pp. 11692-11697] or document 2 [Jonca, F. et al., J. Biol. Chem. (1997), Vol. 272, No. 39, pp. 24203-24209] respectively cited in the ISR.

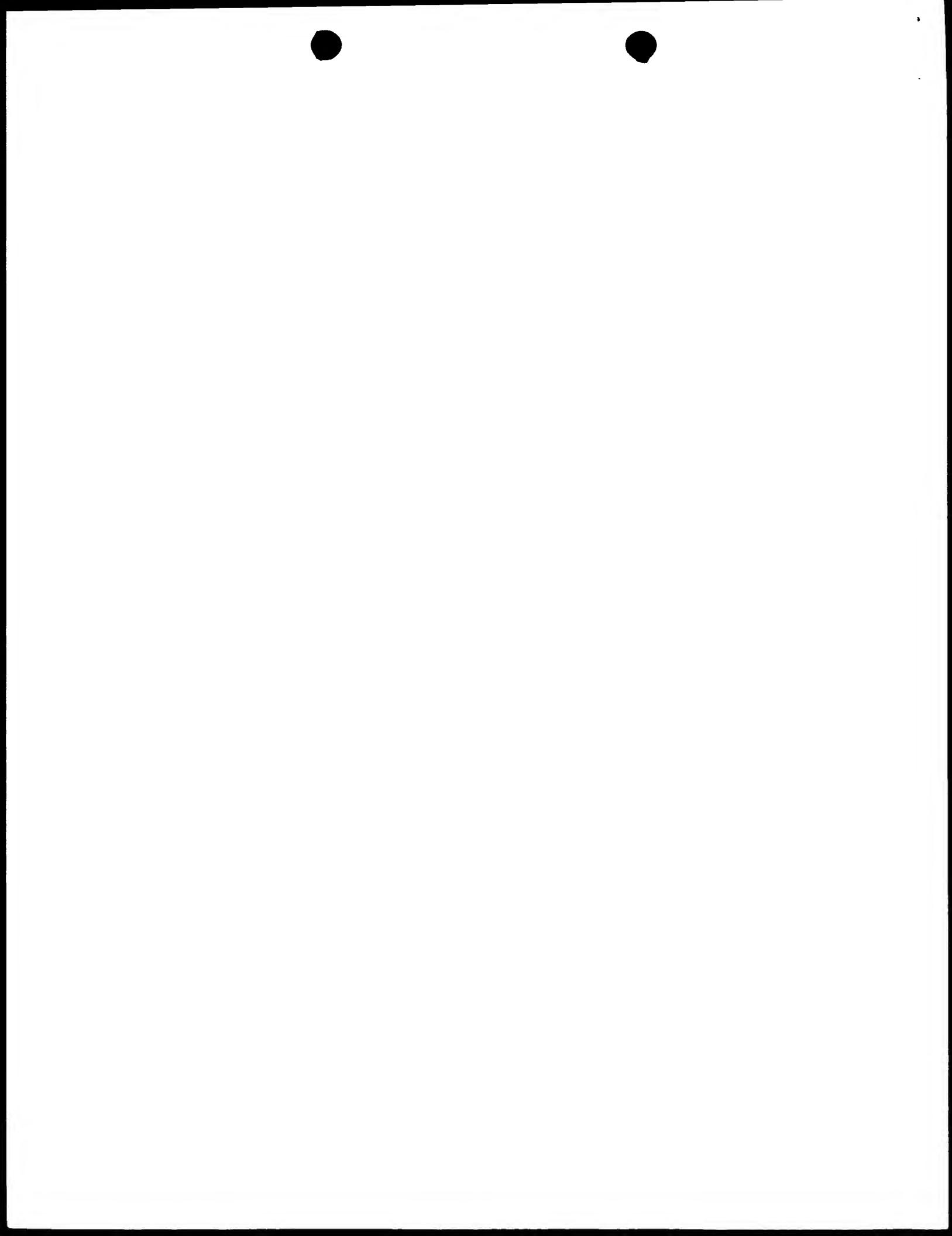
Document 1 describes that there exist receptors respectively having two or more sizes, and that the peptide consisting of the amino acid sequence corresponding to each missed region has physiological activity. Document 2 describes that there exist proteins identical in physiological activity but having two or more sizes, and that the peptide consisting of the amino acid sequence corresponding to each missed region has physiological activity.

So, it could have been easily conceived by a person skilled in the art, to search for a physiologically active substance based on the descriptions of documents 1 and 2, by (1) comparing two or more cDNA sequences of any cDNA encoding a receptor of a cell producing a substance showing antagonism to a substance in vivo or encoding a receptor of a cell producing a substance having antagonism to said cell per se, (2) synthesizing a peptide consisting of an amino acid sequence corresponding to the missed region, and (3) examining whether the peptide has physiological activity.

The subject matters of claims 5-17 do not appear to involve an inventive step in view of documents 1 and 2 and document 3 [Maget, B. et al., Febs Lett. (1994), Vol. 351, No. 2, pp. 271-275], document 4 [Lok, S. et al., Gene (1994), Vol. 140, No. 2, pp. 203-209], document 5 [Gremlich, S. et al., Diabetes (1995), Vol. 44, No. 10, pp. 1202-1208], document 6 [Song, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA (1993), Vol. 90, No. 19, pp. 9085-9089], document 7 [Ito, M. et al., Cell Growth Differ. (1994), Vol. 5., No. 10, pp. 1127-1135] and document 8 (Reisine, T. et al., Mol. Pharmacol. (1993), Vol. 44, No. 5, pp. 1016-1020).

Document 3 describes two or more cDNAs encoding rat glucagon receptor. Document 4 describes a DNA encoding human glucagon receptor. Document 5 describes a DNA encoding glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor. Documents 6 and 7 describe two cDNAs encoding gastrin receptor. Document 8 describes two or more cDNAs encoding somatostatin receptor.

Therefore, it could have been easily conceived by a person skilled in the art, (1) to compare two or more cDNA sequences of any cDNA encoding a receptor described in documents 3-8, (2) to synthesize a peptide consisting of an amino acid sequence corresponding to the missed region, (3) to examine the physiological activity of the peptide and (4) to use the peptide as a drug, based on the descriptions of documents 1 and 2.



**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/JP99/01796

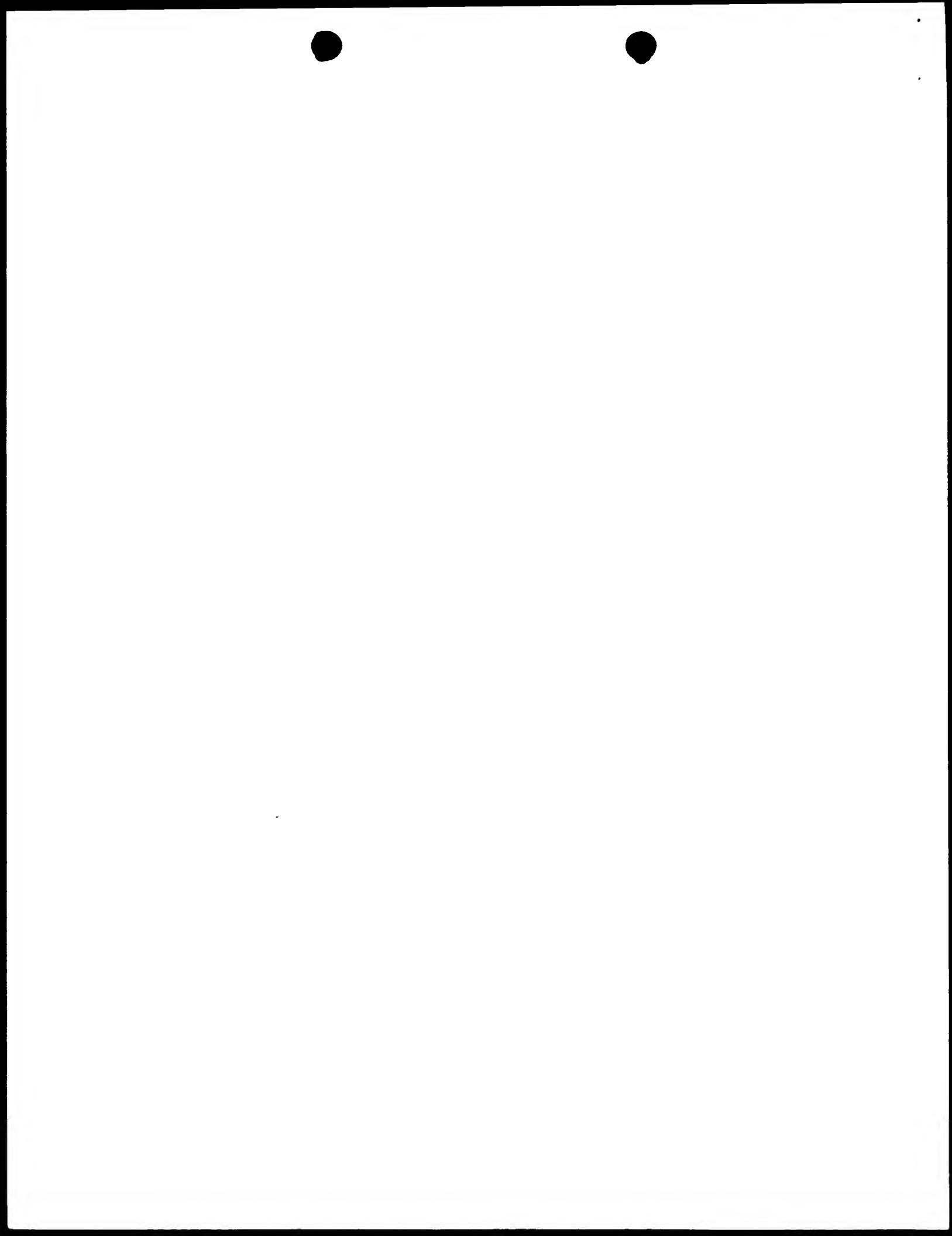
**VI. Certain documents cited**

## 1. Certain published documents (Rule 70.10)

Application No. Patent No.	Publication date (day month year)	Filing date (day month year)	Priority date (valid claim) (day month year)
JP.10-109997.A	28 April 1998 (28.04.1998)	02 October 1996 (02.10.1996)	
[P,X/P,Y]			

## 2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

Kind of non-written disclosure	Date of non-written disclosure (day month year)	Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day month year)



## INTENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
 United States Patent and Trademark  
 Office  
 Box PCT  
 Washington, D.C.20231  
 ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 15 November 1999 (15.11.99)	
International application No. PCT/JP99/01796	Applicant's or agent's file reference 99PF182-PCT
International filing date (day/month/year) 05 April 1999 (05.04.99)	Priority date (day/month/year) 04 April 1998 (04.04.98)
<b>Applicant</b> SAKAMOTO, Kenji	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

02 November 1999 (02.11.99)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

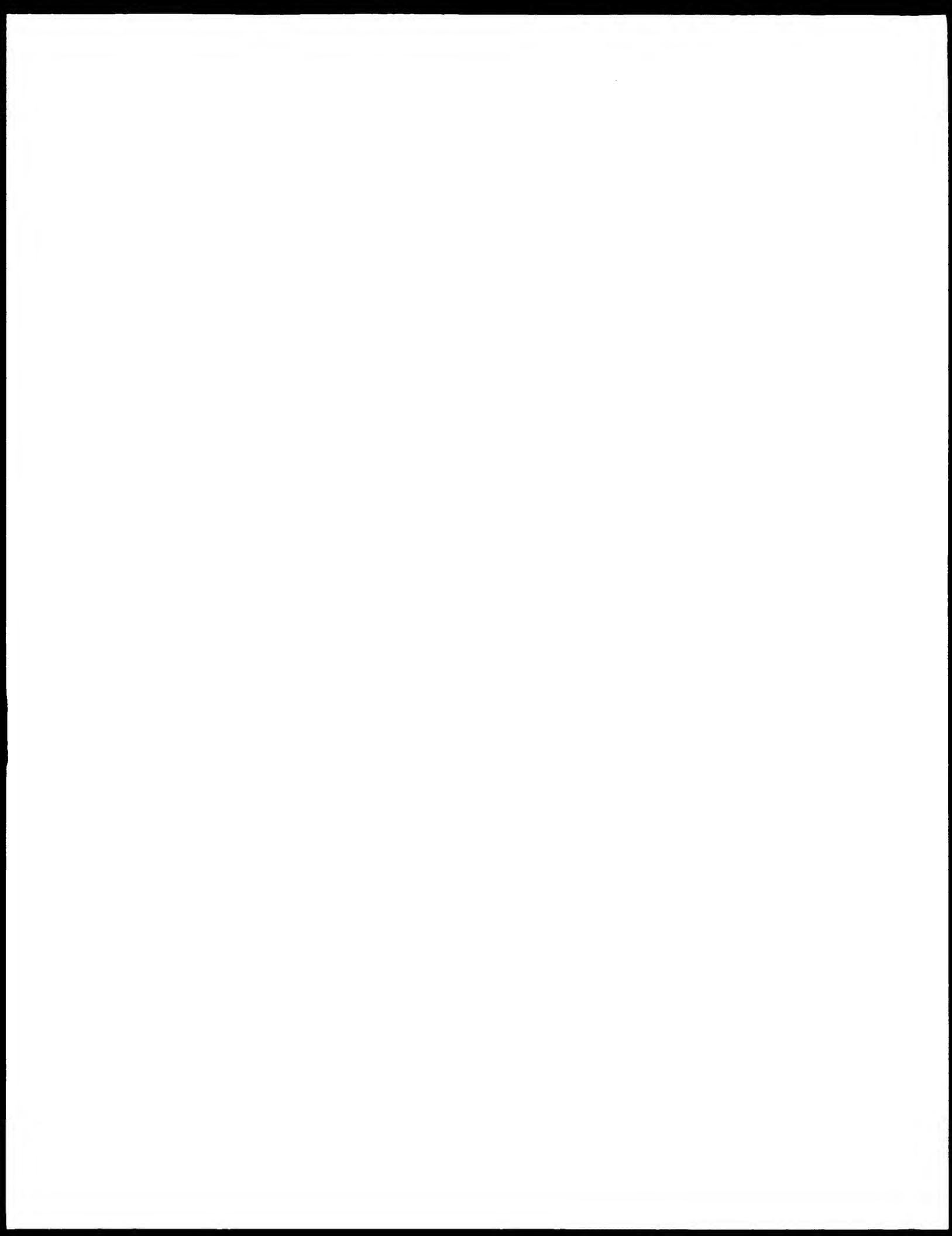
\_\_\_\_\_

2. The election  was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer  Maria Kirchner  Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--



## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
 [PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 99PF182-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。			
国際出願番号 PCT/JP99/01796	国際出願日 (日.月.年)	05.04.99	優先日 (日.月.年)	04.04.98
出願人(氏名又は名称) 坂本 賢二				

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
 この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。  
 この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。  
 この国際出願に含まれる書面による配列表

この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2.  請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3.  発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は  出願人が提出したものと承認する。

次に示すように国際調査機関が作成した。

## 5. 要約は

出願人が提出したものと承認する。

第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

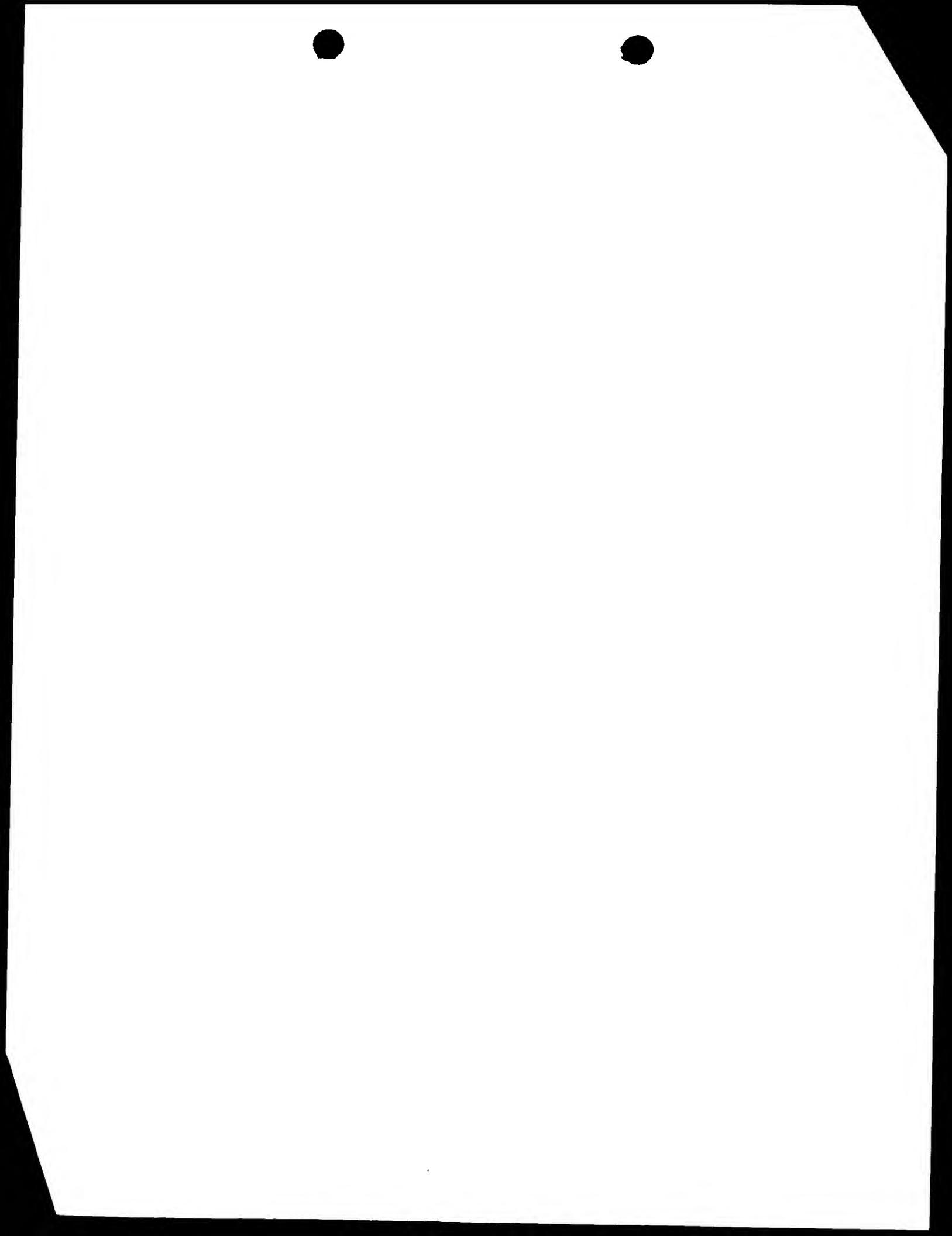
## 6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。  出願人が示したとおりである。

なし

出願人は図を示さなかった。

本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl<sup>6</sup> C07K 7/06, A61K 38/26, A61K 38/30, A61K 38/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl<sup>6</sup> C07K 7/06, A61K 38/26, A61K 38/30, A61K 38/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

REGISTRY(STN), CA(STN), MEDLINE(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG),  
GenBank/EMBL/DDBJ, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X P, Y	JP, 10-109997, A (坂本 賢二) 28.4月.1998 (28.04.98) & WO, 98/14479, A1 & AU, 9744707, A	1-4 5-17
X Y	NARANDA, T. et al. "A peptide derived from an extracellular domain selectively inhibits receptor internalization: target sequences on insulin and insulin-like growth factor 1 receptors", Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1997) Vol. 94, No. 21, p. 11692-11697	1-4 5-17
X Y	JONCA, F. et al. "Cell release of bioactive fibroblast growth factor 2 by exon 6-encoded sequence of vascular endothelial growth factor", J. Biol. Chem. (1997) Vol. 272, No. 39, p. 24203-24209	1-4 5-17

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるか、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30.06.99

国際調査報告の発送日

13.07.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

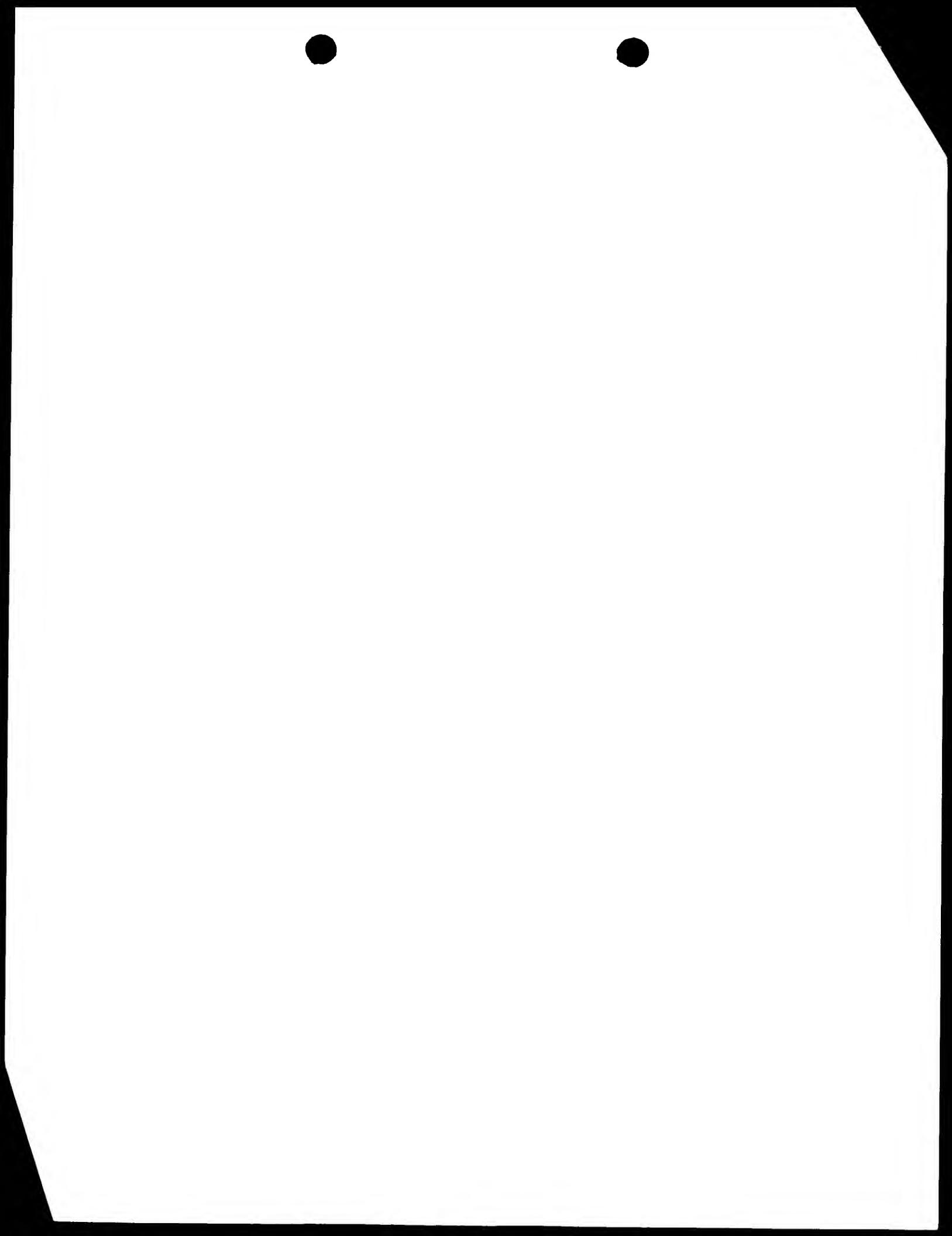
特許庁審査官（権限のある職員）

高堀 栄二

4B 9281



電話番号 03-3581-1101 内線 3448



C(続き)、関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	MAGET, B. et al. "Sequencing of eleven introns in genomic DNA encoding rat glucagon receptor and multiple alternative splicing of its mRNA", FEBS Lett. (1994) Vol. 351, No. 2, p. 271-275	5-6
Y	LOK, S. et al. "The human glucagon receptor encoding gene: structure, cDNA sequence and chromosomal localization", Gene (1994) Vol. 140, No. 2, p. 203-209	5, 7
Y	GREMLICH, S. et al. "Cloning, functional expression, and chromosomal localization of the human pancreatic islet glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor", Diabetes (1995) Vol. 44, No. 10, p. 1202-1208	8-11
Y	SONG, I. et al. "The human gastrin/cholecystokinin type B receptor gene: alternative splice donor site in exon 4 generates two variant mRNAs", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) Vol. 90, No. 19, p. 9085-9089	12-14
Y	ITO, M. et al. "Functional characterization of two cholecystokinin-B/gastrin receptor isoforms: a preferential splice donor site in the human receptor gene", Cell Growth Differ. (1994) Vol. 5, No. 10, p. 1127-1135	12-14
Y	REISINE, T. et al. "Splice variant of the somatostatin receptor 2 subtype, somatostatin receptor 2B, couples to adenylyl cyclase", Mol. Pharmacol. (1993) Vol. 44, No. 5, p. 1016-1020	15-17
A	NUSSENZVEIG, D. R. et al. "Inhibition of inositol phosphate second messenger formation by intracellular loop one of a human calcitonin receptor. Expression and mutational analysis of synthetic receptor genes", J. Biol. Chem. (1994) Vol. 269, No. 45, p. 28123-28129	1-17

